



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



UTJECAJ KVASACA NA KVALITETU ŽITNOG DESTILATA

DIPLOMSKI RAD

Ivan Počepan

Zagreb, Rujan, 2019.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Hortikultura: Vinogradarstvo i vinarstvo

UTJECAJ KVASACA NA KVALITETU ŽITNOG DESTILATA

DIPLOMSKI RAD

Ivan Počepan

Mentor:

doc. dr. sc. Marin Mihaljević Žulj

Zagreb, Rujan, 2019.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Ivan Počepan**, JMBAG 0178103124, rođen/a 8.1.1996. u Virovitici, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

UTJECAJ KVASACA NA KVALITETU ŽITNOG DESTILATA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Ivan Počepan**, JMBAG 0178103124, naslova

UTJECAJ KVASCA NA KVALITETU ŽITNOG DESTILATA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | | |
|----|--|---------------------|-------|
| 1. | doc. dr. sc. Marin Mihaljević Žulj | mentor | _____ |
| 2. | doc. dr. sc. Nenad Jalšenjak | član | _____ |
| 3. | izv. prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka | član | _____ |
| | mag. ing. Marko Viskić | neposredni voditelj | _____ |

Zahvala

Ovime zahvaljujem obitelji koja mi je ovo omogućila, kolegama po kojima ću pamtit i svoje studentske dane, profesorima od kojih sam toliko naučio te najdražoj djevojci, bez koje ne bih izdržao.

Sadržaj

Uvod.....	1
Pregled literature.....	2
Utjecaj kvasca	2
Inokulacija	4
Fermentacija.....	5
Tijek fermentacije	5
Promjene u sladovini.....	7
Kontaminacija	8
Produkti metabolizma kvasaca bitni za kvalitetu destilata	9
Karbonilni spojevi.....	9
Viši alkoholi.....	10
Kiseline	11
Esteri.....	12
Materijali i metode	13
Rezultati i rasprava	14
Zaključak.....	19
Literatura.....	20
Internet stranice	23

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Ivan Počepan**, naslova

UTJECAJ KVASACA NA KVALITETU ŽITNOG DESTILATA

Izbor kvasca za proizvodnju žitnog destilata može uvelike utjecati na prinos etanola i konačnu kvalitetu proizvoda, a činjenica kako vrsta i soj kvasca nije propisan regulativama ostavlja prostor za mnoga istraživanja u ovom području. Cilj rada je ispitati utjecaj dvaju sojeva kvasaca različitih namjena na kvalitetu destilata dobivenog dvostrukom destilacijom fermentirane sladovine na jednostavnom destilacijskom uređaju. Prvi korišteni kvasac (A, *Saccharomyces cerevisiae*) komercijalnog je naziva FERMOALE AY4 američke proizvodnje. Drugi kvasac (B) je soja *Saccharomyces cerevisiae* (*ex. bayanus*) pod imenom EC-1118 proizvođača Lalvin. Kemijskom analizom utvrđeno je kako kvasac A očekivano ima bolji prinos u etanolu (3 % više etanola), nižu titracijsku kiselost, dok su koncentracije etil acetata bile malo više u uzorku kvasca B. Na plinskom kromatografu SRI 8610C utvrđene su povišene koncentracije acetaldehida, uzorak A imao je 274 mg/L a.a., a uzorak B 356 mg/L a.a. Nadalje, koncentracije viših alkohola u oba su uzorka bile povišene. Uzorak A imao je 2161 mg/L a.a, dok uzorak B, sa 3571 mg/L a.a. ukupnih viših alkohola, već ulazi u kategoriju destilata niže kvalitete. Uzorak B bio je bogatiji etil acetatom, dok je uzorak A imao više koncentracije ostalih estera što je rezultiralo kompleksnijom aromom i punijim okusom destilata A. Interesantno bi bilo ispitati utjecaj ovih kvasaca u uvjetima fermentacije prilagođenim onima u destileriji; brza fermentacija u uvjetima visoke temperature u mediju visoke specifične težine.

Ključne riječi: žitni destilat, kvasac, hlapivi spojevi, kromatografija, esteri, viši alkoholi

Summary

Of the master's thesis – student **Ivan Počepan**, entitled

EFFECT OF YEAST ON CEREAL SPIRIT QUALITY

The choice of yeast for cereal spirit production can greatly affect ethanol yield, as well as final product quality. In addition, the fact that yeast type and variety aren't regulated, leaves great room for research in this field. The aim of this study was to evaluate the effect of two different yeast types on the quality of spirit produced by double distilling a fermented cereal wash on a simple still. The first used yeast (A, *Saccharomyces cerevisiae*) is called FERMOALE AY4 and is produced in USA. The other yeast (B) *Saccharomyces cerevisiae* (*ex. bayanus*) is called EC1118 and is made by Lalvin. Chemical analysis proved that yeast A, as expected, has a better ethanol yield (3 % more ethanol), lower titratable acidity, while ethyl acetate concentrations were slightly higher in sample B. Gas chromatography on chromatograph SRI 8610C identified higher acetaldehyde concentrations, sample A had 274 mg/L a.a. and sample B had 356 mg/L a.a.. Furthermore, larger amounts of higher alcohols were produced in both samples, sample A had 2161 mg/L a.a. while sample B, with 3571 mg/L a.a. total higher alcohols, enters the lesser quality spirit rank. While sample B was richer with ethyl acetate, sample A had higher concentrations of other esters which made sample A a distillate with more complex aroma and fuller flavour. Future experiments could yield interesting results if the fermentation conditions would match those in a distillery; rapid, high temperature fermentation in high gravity medium.

Keywords: cereal spirit, yeast, flavour congeners, chromatography, ester, higher alcohols

Uvod

Žitni destilat je proizveden destilacijom fermentirane žitne kaše, a odležavanjem i dozrijevanjem u bačvi dobije se whisky. U usporedbi sa ostalim jakim alkoholnim pićima, whisky ima izrazito kompleksne okusne karakteristike koje su isključivo rezultat prirodnih procesa tijekom proizvodnje. Najpoznatiji je onaj proizveden u Škotskoj, Irskoj, SAD-u, Kanadi i Japanu. Dugom tradicijom i povijesti ovoga proizvoda razvila su se dva načina pisanja ove riječi: whisky i whiskey. Whisky je naziv koji se koristi u Škotskoj ili zemljama na čiju je proizvodnju utjecala ova zemlja, kao što su Kanada, Indija i Japan, te slabije poznati proizvodi Engleske i Walesa. Irska i SAD koriste naziv whiskey. Glavni, a ujedno i najpoznatiji tipovi whiskyja mogu se podijeliti prema porijeklu na Škotski ili Scotch, Irski ili Irish, Japanski i Američki (za koji valja navesti Bourbon, Tennessee, Rye i Corn Whiskey). Svaka od navedenih zemalja ima svoju regulaciju i pravilnike prema kojima se proizvodi određeni whisky. Većinom ovih pravilnika određeni tip bude i geografski zaštićen, primjerice škotski whisky mora biti destilirani i dozrijevan u Škotskoj. Prema pravilniku Europske unije o jakim alkoholnim pićima (NN 61/2009) whisky se proizvodi destilacijom fermentirane žitne kaše, sa ili bez cijelih žitarica koje su bile ošećerene diastazom iz slada, sa ili bez drugih prirodnih enzima te prevrela uz dodatak kvasca. Destilat se dobiva jednom ili više destilacija na manje od 94,8 % vol., tako da destilat zadržava miris i okus po upotrijebljenoj sirovini. Konačno, whisky mora dozrijevati najmanje tri godine u drvenoj bačvi zapremnine do 700 litara.

Izbor kvasca za proizvodnju žitnog destilata može uvelike utjecati na prinos etanola i konačnu kvalitetu proizvoda, a činjenica kako vrsta i soj kvasca nije propisan regulativama ostavlja mogućnost mnogim istraživanjima na ovom području. Zato se u novije vrijeme javljaju radovi koji se bave upravo ovom problematikom. Cilj ovog rada je ispitati utjecaj dva soja kvasaca različitih namjena na kvalitetu destilata dobivenog dvostrukom destilacijom fermentirane sladovine na jednostavnom destilacijskom uređaju. Prvi korišteni kvasac je soj *Saccharomyces cerevisiae* (ex. *bayanus*) pod imenom EC-1118 proizvođača Lalvin. Drugi kvasac koji je korišten komercijalnog je naziva FERMOALE AY4 američke proizvodnje.

Pregled literature

Utjecaj kvasca

Izvor hlapivih spojeva novodobivenog destilata jesu:

- Sladovina, odnosno žitarica koja se koristi
- Hlapive strukturne komponente kvasca
- Produkt metabolizma kvasca
- Mikrobiološka kontaminacija fermentacije.

Stoga kvasac i sam proces fermentacije igraju važnu ulogu u proizvodnji whiskyja, dapače, za Škotski whisky je zakonski propisano kako mora sadržavati aromu i okus specifične za fermentaciju i kvasce. Proces fermentacije u destileriji sličan je onome u pivarstvu, stoga većina informacija i opće shvaćanje ovoga procesa dolazi od literature vezane primarno uz pivarstvo (Hough i sur., 1982.; Young, 1996.; Boulton i Quain, 2001.; Slaughter, 2002.).

Barnett i sur. su 1990. pisali o radu Hansena u Carlsberg Laboratories iz Danske 1880-ih. Hansen je tada opisivao različite vrste kvasaca koji su se razlikovali kako po obliku, tako i po načinu fermentiranja, a shodno tome razlike su bile i u samoj namjeni kvasaca. U praksi se danas radi različitih industrijskih obilježja kvasci *Saccharomyces cerevisiae* mogu ugrubo podijeliti upravo prema njihovoj namjeni: pekarske, pivarske, vinske i destilacijske. Većina ovih kvasaca nastali su kao hibridi različitih sojeva unutar ovoga roda koji svojim osobinama daju najbolje rezultate u svojoj namjeni. Također, interesantna je objava Nykanena (1985.) kako isti kvasac istom tehnikom, ali u različitim sirovinama daju nevjerojatno sličan aromatski i okusni sastav pića. U novije vrijeme se na ovom području javljaju istraživanja kao što na primjer Neto i sur. (2009.) uspoređuju pekarski kvasac korišten u proizvodnju bioetanola i selekcionirani destilacijski kvasac ili „Kvasac radionica“ koju je 2003. godine organizirao Institut za istraživanje Škotskog Whiskya.

Kako je cilj ovoga rada ispitati utjecaj dva soja kvasca na kvalitetu destilata, bitno je navesti glavna obilježja kvasca za destilaciju (Prema Campbell, 2003.):

- Dobar razvoj okusa
- Potpuna i brza fermentacija šećera iz sladovine
- Otpornost na osmotski stres
- Sposobnost za dovođenje fermentacije kraju u posljednjih 8-10 % sadržaja etanola u sladovini
- Slabija flokulacija i minimalno pjenjenje
- Sposobnost dobrog rasta i na temperaturama iznad 30 °C.

Biokemija kvasca i njegova metabolizma pregledno je opisana u drugoj literaturi (Campbell 2003., Buglass i sur. 2011.), a u ovom radu će se više pažnje posvetiti kvaliteti dobivenog destilata. Kako je riječ o utjecaju kvasaca, za problematiku ovoga rada važan je razvoj hlapivih spojeva tijekom fermentacije. U pivarstvu bitan utjecaj na okus piva imaju

tehnološki zahvati podešavanja sastava sladovine (Hough i sur., 1982.; Young, 1996.; Slaughter, 2002.). Ovo je u proizvodnji škotskog whiskyja zakonski zabranjeno te stoga ovaj čimbenik ne ubrajamo na sljedeći popis; čimbenici koji utječu na razvoj hlapivih spojeva jesu (Campbell, 2003.):

- Genetska obilježja soja kvasca
- Stanje kvasca pri inokulaciji (broj živih i sposobnih za život)
- Količina inokuluma kvasca
- Početna aeracija sladovine
- Temperaturni režim fermentacije
- Mikrobiološka kontaminacija.

Shodno navedenim čimbenicima, u tablici 1 je sažeti prikaz utjecaja fermentacije na razvoj hlapivih spojeva.

Tablica 1. Čimbenici koji utječu na kvašćev razvoj estera i viših alkohola. (Campbell, 2003.).

Uvjeti rasta	Utjecaj na razvoj viših alkohola	Utjecaj na razvoj estera
Povećan rast kvasca (viša temperatura, više O ₂)	Rast (manje dostupnog NH ₂)	Pad (manje recikliranja CoA)
Smanjen rast kvasca (niža temperatura, manje O ₂)	Pad (više dostupnog NH ₂)	Rast (više recikliranja CoA)
Manjak amino N	Rast (manje dostupnog NH ₂)	Najčešće pad (ako je slabiji rast kvasca, manje recikliranja CoA)
Redox utjecaj		
a) Deficijencija NAD ⁺	Rast (za generiranje NAD)	Neutralno, ili rast ako je slabiji rast kvasca
b) Suficijencija NAD ⁺	Neutralno ili pad	Neutralno, ili pad ako je veći rast kvasca
Genetska obilježja kvasca	Rast ili pad, ovisno o genetskim obilježjima kvasca.	

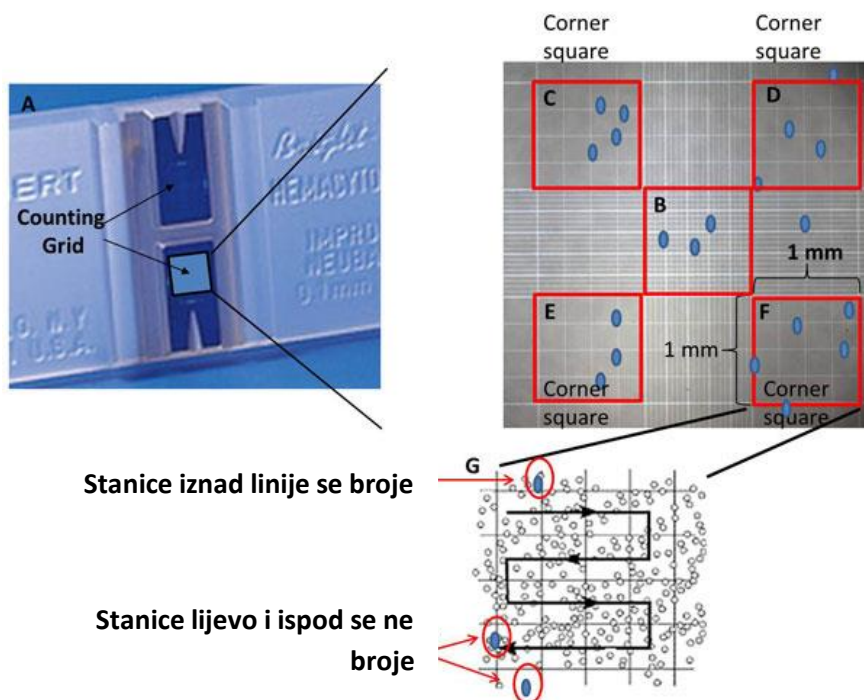
Izvor: Campbell, 2003.

Temperatura fermentacije ima veoma važnu ulogu te je u pivarstvu bila glavna tema istraživanja 60-ih i 70-ih godina prošloga stoljeća. U pravilu, viša temperatura fermentacije znači i veći rast kvasca u proporciji sa dostupnim α -amino dušikom, što rezultira i većom proizvodnjom viših alkohola (Enari i sur., 1970.). S druge strane, kako veći rast znači manje recikliranja CoA, proizvodnja estera je reducirana. U praksi, temperatura fermentacije se ne kontrolira u destilerijama kao u pivovarama, ali potrebno je biti dosljedan u sukcesivnim fermentacijama kako ne bi bilo prevelikih oscilacija u hlapivim spojevima. Konačno, valja istaknuti čimbenik genetskih obilježja kvasca. Ne postoje dva različita soja kvasca koji će jednako reagirati na temperaturu fermentacije, otopljeni kisik ili sadržaj dušika u sladovini. Zbog toga različite kulture kvasca mogu dati osjetno drugačije destilate.

Od kraja prošloga stoljeća u modu ulaze arome estera u destilatu, pa su tako već Hay i sur. (1994.) proizveli soj kvasaca za proizvodnju destilata koji daje više etanola te navedenu aromu.

Inokulacija

Pravilan tijek fermentacije zahtijeva zadovoljavajuću kvalitetu i količinu kvasaca. Za praćenje procesa fermentacije potrebno je mjeriti biomasu kvasaca ili brojiti stanice. U proizvodnji to se radi vaganjem mase kvasca koji će se dodati, ili preciznija metoda, brojanjem stanica u mililitru na haemocytometru (slika 1). S druge strane, kvaliteta kvasca je postotak živih stanica u populaciji. Za ovo se koristi test sa plavim metilenom (MB – methylene blue), metoda koju je još Baker (1991.) opisao kao najviše korištenu. Metoda se temelji na činjenici da žive stanice slabo vežu MB, ako uopće, a one koje ga vežu ga brzo metabolizmom prevedu u bezbojni reducirani oblik. Mrtve stanice su propusne za MB te, zato što ne metaboliziraju, budu obojane. Dalje je postupak isti kao normalno brojanje stanica na haemocytometru, a vitalnost kvasca se izrazi kao broj živih stanica podijeljen sa ukupnim brojem stanica.



Slika 1. Brojanje živih stanica na haemocytometru. (slika preuzeta sa www.bitesizebio.com)

Svježi kvasac za destilaciju treba imati vitalnost blizu 100% i taj broj bi trebao zadržati do nekoliko tjedana skladišten na 3-4°C. Skladištenje na sobnoj temperaturi nije prihvatljivo iz dva razloga: gubitak na vitalnosti kvasca i brz rast bakterijskih kontaminanata koje je nemoguće potpuno ukloniti u proizvodnji kvasca. Vitalnost kvasaca na kraju fermentacije u pivovari će teško biti iznad 95%, a opadati će i dalje tokom transporta i skladištenja. Jones (1998.) je istaknuo kako kvasac dobiven anaerobnom fermentacijom nikada neće imati stabilnost pri skladištenju kao onaj dobiven aerobno. Campbell (2003.) navodi kako je realno tražiti 90%-tnu vitalnost kvasca pri kupnji. Valja napomenuti kako je kvasac iz piva dobivenog

tradicionalnim kuhanjem hmelja zaštićen baktericidnim djelovanjem izo α -kiselina, dok to djelovanje nije zapaženo kada su pre-izomerizirane α -kiseline dodane post-fermentacijskom obradom (Hardy i Brown, 1989.). Naravno vitalnost kvasca iz fermentacije sladovine visoke specifične težine će uvijek biti niža (Pratt-Marshall i sur., 2002.).

Prije fermentacije je bitno dobro prozračiti sladovinu kako bi pospješili dobar rast kvasaca. Tijekom faze rasta kvasca u sladovini, vitalnost će dosegnuti 100% jer samo živi kvasci rastu, a kasnije, zbog povećanje koncentracije alkohola, pada pH i povišene temperature taj postotak opada.

Danas se kvaliteta kvasca, osim broj živih stanica, gleda i kao njegova sposobnost da brzo i efikasno fermentira. Najbolja metoda za mjerenje ovoga je praćenje pada pH zbog ekskrecije H^+ iona pri unosu kvasca u fermentabilni supstrat (Kara i sur., 1988.). Drugu, točniju, ali i kompleksniju metodu je opisao Mochaba i sur. (1997.) kao metodu temeljenu na istom principu, mjerenjem ekskrecije iona Mg^{2+} .

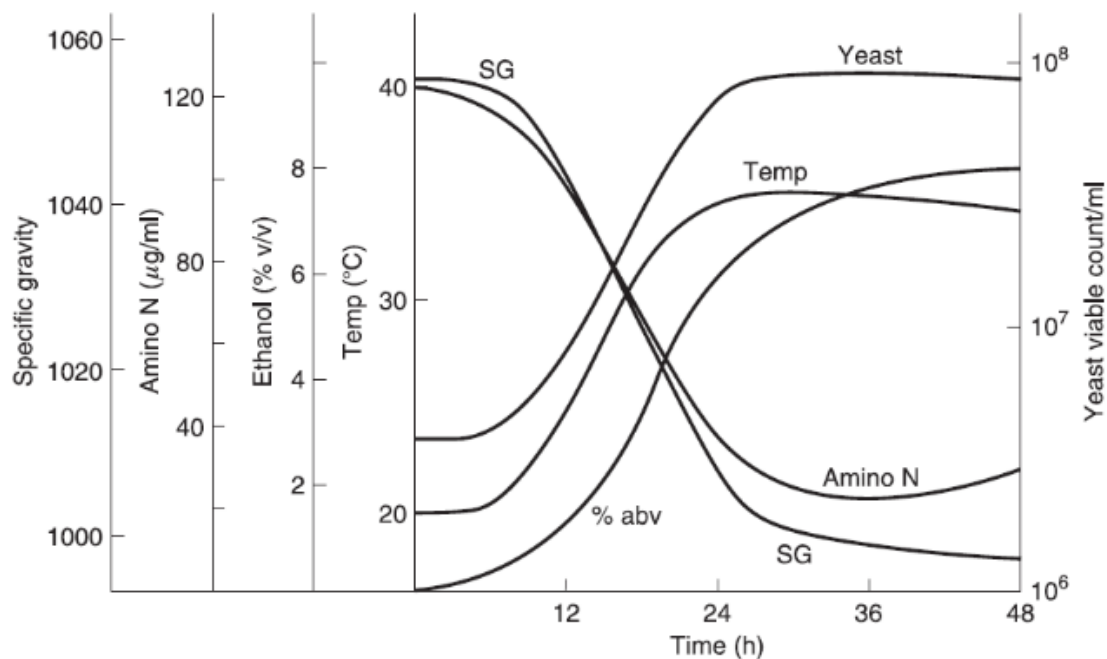
Campbell (2003.) je naveo kako se u praksi stavlja 18 kg suhe mase kvasca na jednu tonu slada. Izraženo brojem stanica, 1,8% težine slada odgovara $3-4 \times 10^7$ stanica/ml, ovisno o specifičnoj težini sladovine. Također, ako se koristi mješavina pivskih kvasaca i onih za destilate, količina suhe mase kvasca može doseći 22 kg zbog slabije vitalnosti pivskog kvasca. Slabija inokulacija očituje se manjom količinom destilata jer kvasac koristi šećer za proizvodnju stanične mase umjesto etanola.

Fermentacija

Većina literature dostupne za fermentacije u pivovari, može se primijeniti i u destileriji. Najbitnija razlika u destileriji je izostanak mikrobiološke sterilizacije i inaktivacije amilolitičkih enzima što se događa pri kuhanju sladovine sa hmeljem na 100 °C. Ovo je jedan od razloga zašto je u proizvodnji destilata bolje iskorištenje šećera te veća proizvodnja etanola, odnosno specifična težina sladovine pri fermentaciji može doći do 997°-998° u usporedbi sa pivovarom gdje fermentacije staju na 1005°-1010° (Campbell, 2003.). Za procjenu dobivenog alkohola radom kvasaca u destileriji koristi se faktor 0.131 koji se za dobivanje navedene vrijednosti množi sa razlikom početne specifične težine i one na kraju fermentacije, dok je u pivarstvu taj faktor 0.129. Nadalje, bitna razlika u proizvodnji škotskog whiskyja je što nisu dozvoljene radnje kao manipulacija temperature, mijenjanje sastava sladovine kao ni dodavanje hrane za kvasce.

Tijek fermentacije

Medij u kojem se kvasac nalazi je sladovina, dobivena ukomljenim ili neukomljenim žitaricama. Ovakav medij predstavlja okolinu bogatu ugljikom, dušikom i mineralnim hranjivima za kvasac, dok primarni nedostatak jesu nezasićene masne kiseline i steroli (Campbell, 2003.). Rast kvasca u fermentaciji za destilat prikazan je na grafu 1.



Graf 1. Proces fermentacije sladovine za destilaciju. (Campbell, 2003.)

Aktivan rast kvasca završava nakon 24 sata i ovdje prestaje rast temperature, no fermentacija šećera nastavlja pa je zato zabilježen daljnji pad specifične težine te rast sadržaja etanola. S druge strane, završetkom rasta kvasca, više nema potrošnje α -amino dušika, njegov sadržaj ne opada već se kasnije poveća autolizom stanica kvasaca.

Još jedna razlika u odnosu na fermentaciju u pivarstvu jest kontrola temperature. Dok se u pivarstvu temperatura strogo kontrolira sa odstupanjima od 0,5 °C, u destilaciji to je drugačiji slučaj. U destilaciji se temperatura sladovine održava na temperaturi oko 20 °C, ovisno o okolinskim uvjetima, tako da najviša temperatura dosegne 33-34 °C. U slučaju da bi temperatura premašila ovu gornju granicu, tank se može hladiti sustavima za hlađenje vodom ili rashladnom tekućinom. Komercijalni kvasac za destilaciju dobro fermentira do 34-35 °C, a na višim temperaturama aktivnost mu rapidno opada (Campbell, 2003.). Pivski kvasac također može rasti na temperaturama do 33-34 °C, ali za lager kvasac je to previsoko, njegov tipični maksimum je 28-30 °C (Walsh i Martin, 1978.). Naravno ovakav kvasac se svejedno može koristiti kao „ispomoć“ destilacijskom kvascu na početku fermentacije, a kasnije još može dati i određene hlapive spojeve zahvaljujući svojim strukturnim komponentama.

Prvi dio fermentacije, u pravilu 6 sati nakon inokulacije, zove se lag faza zato što broj stanica ostaje isti. Ovo je period intenzivne biokemijske aktivnosti kada se kvasac prilagođava novoj okolini. Ako se u ovoj fazi i dogodi određeni rast, ovo je balansirano smrću onih stanica koje su odumrle zbog osmotskog šoka pri transferu u slakovinu bogatu šećerom.

Nakon 6 sati, kreće log faza rasta u kojoj se povećava broj stanica. U pivarstvu se broj stanica poveća 8-10 puta, odnosno 3 generacije i 4. u manjoj mjeri što je manje od onog u destilaciji

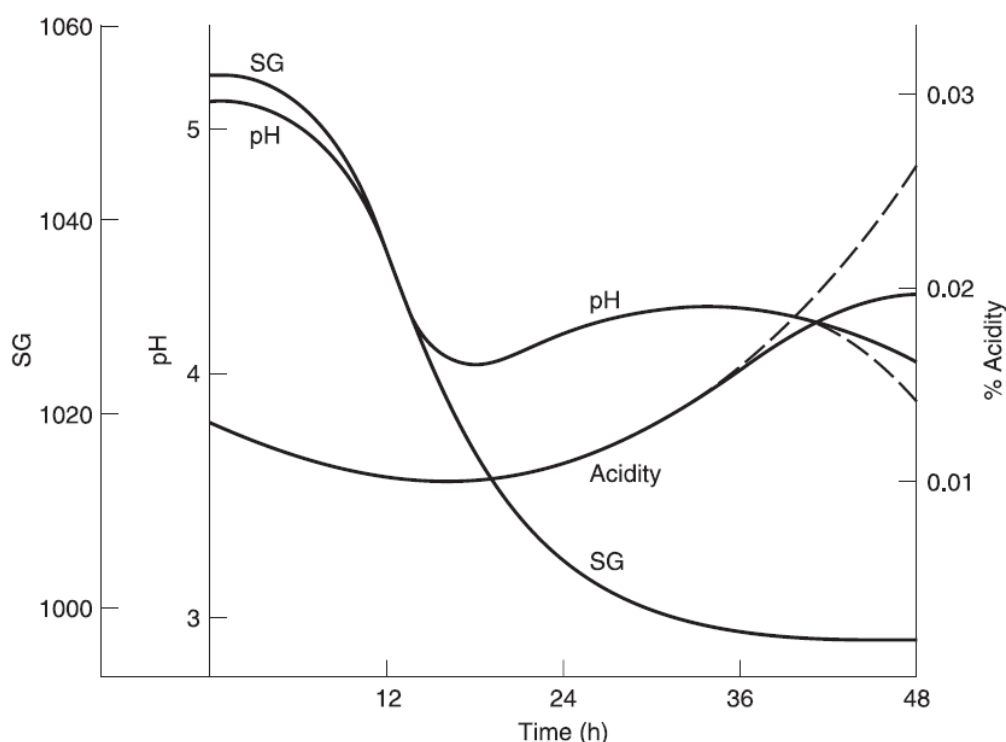
zato što se u pivovari kvasac najčešće reciklira. Daljnji rast nije moguć zbog nedostatka membranskih komponenti, nezasićenih masnih kiselina i sterola koji se ne mogu sintetizirati u anaerobnim uvjetima fermentacije. Destilacijski kvasac uzgojen je u aerobnim uvjetima snažnog rasta gdje je generirao višak navedenih esencijalnih lipida. U dobro aeriranoj sladovini to mu omogućuje povećanje broja stanica od čak 20 puta (blago preko 4 generacije). Sa temperaturnim režimom tijekom fermentacije, log faza konačno staje nakon 18-24 sata te ulazi u stacionarnu fazu.

U stacionarnoj fazi nedostatak membranskih lipida je ograničavajući faktor rasta kvasaca. Metabolička aktivnost nastavlja sljedećih 12-24 sata laganijom brzinom, a broj nastalih novih stanica kvasaca bude proporcionalan onom odumrlih i autoliziranih.

Konačno, rast kvasaca staje te se broj odumrlih i autoliziranih stanica povećava što označava fazu odumiranja. Ovo se događa na kraju 48-satnog perioda unutar kojega završava većina destilerijskih fermentacija.

Promjene u sladovini

Kvasac tijekom fermentacije izlučuje H^+ ione što rezultira padom pH vrijednosti sladovine. Graf 2 prikazuje kretanje pH sladovine koje je Campbell (2003.) prikazao prema podacima Dolana (1976.). Vrijednost pH kreće od 5.4 pa opada do 4.0-4.1, no u stacionarnoj fazi neznatno poraste radi otpuštanja aminokiselina pri autolizi.



Graf 2. Varijacije pH vrijednosti sladovine za destilaciju tijekom fermentacije (Dolan, 1976.). Isprekidane linije prikazuju utjecaj kontaminacije laktobakterijama (Campbell, 2003.).

Ovakva promjena u pH ima utjecaj na α - i β -amilazu, ograničava dekstrinazu pa tako i na hidrolizu polisaharida tijekom fermentacije. Škrob i dekstrini preostali nakon ukomljavanja hidroliziraju se najviše tijekom lag faze, a daljnjom fermentacijom i padom pH aktivnost ovih enzima opada. Prema Campbellu (2003.) amilolitička aktivnost opada snižavanjem pH te konačno staje na pH 4.4. Kako se sladovina u proizvodnji whiskyja ne smije dorađivati (korekcija pH), ovdje pivski kvasac ima predost jer su pH vrijednosti sladovine za 0.2 više tijekom fermentacije. Više polisaharida će se hidrolizirati te će biti veći prinos u etanolu. S druge strane, kontaminacija mliječnim bakterijama u ranim fazama fermentacije može spustiti pH što smanjuje prinos etanola.

Na grafu 2 opisan je utjecaj bakterija mliječnog vrenja. Ako se pojave u kasnijim fazama i koriste autolizat kvasca kao hranu, pH može pasti do 3.8. Mliječne bakterije hrane se rezidualnim dekstrinima i pentozama koje kvasac ne može fermentirati, trehalozom i dušičnim spojevima kao produktima autolize kvasca. Određeni radovi (Geddes, 1985.; Barbour i Priest, 1988.) opisali su pozitivan utjecaj ove kontaminacije na hlapive spojeve fermentirane sladovine te konačno whiskyja. Stoga nije preporučeno prelaziti na destilaciju ako je fermentacija završila prije 48 sati, već pustiti da mliječne bakterije pridonesu razvoju okusa. Neke destilerije fermentiraju i duže od 48 sati kako bi imali što veći utjecaj ovih bakterija. Prema Dolanu (1976.) ova kontaminacija u ranijim fazama fermentacije nije dobrodošla zbog gubitka na količini dobivenog etanola pošto mliječne bakterije tada fermentiraju i ostale šećere.

U fermentaciji se mogu javiti pojave pjenjenja i flokulacije. Pjenjenje se najčešće događa tijekom burne fermentacije što se uglavnom kontrolira rotacijskom lopaticom pri vrhu fermentacijskog tijela. Neki sojevi pivskih kvasaca pjene više od ostalih te ove osobine pokazuju i u kombinaciji sa destilacijskim kvascem. Također se sumnja na to kako određeni kultivari ječma utječu na izrazito pjenjenje tijekom fermentacije i čak destilacije. Rješenje bi bilo dodavanje komercijalnih tvari protiv pjenjenja. Flokulacija je naziv za spontano nakupljanje stanica kvasca u veće agregate koji se zatim lakše talože zbog povećanja mase (Stratford, 1992.). Na ovu pojavu se pivari oslanjaju kako bi se pivo djelomično izbistrilo do kraja fermentacije, dok je u destileriji to izrazito nepoželjna pojava. Flokulirani kvasac koji dođe u kontakt sa površinom za zagrijavanje pri destilaciji će zagorjeti čime se ograničava prijenos topline te izaziva mane u okusu destilata. Stoga treba obratiti pažnju na ovaj problem pri korištenju ale pivskih kvasaca.

Kontaminacija

Mikrobiološka kontaminacija fermentacije može biti izvor povoljnih okusa u konačnom destilatu, ali isto tako i mana. Primarni izvori neizbježnih kontaminanata u destilerijskoj fermentaciji jesu mikrobiološka flora slada (octene i mliječne bakterije te aerobni kvasci), rezidui kontaminanata na drvenim stjenkama tijela za fermentaciju i sam kvasac kojim se inokulira. Glavni razlog zašto se ova kontaminacija javlja u proizvodnji destilata, a ne u pivarstvu je već navedeni izostanak prokuhavanja sladovine na 100 °C. U destileriji se proces

ukomljavanja provodi na temperaturama oko 63-65 °C koje će smanjiti broj organizama kvarenja, ali neće sterilizirati sladovinu (Geddes, 1985.). Jedini drugi antimikrobiološki učinak u sladovini prije fermentacije ima osmotski stres koncentracije šećera. Kada fermentacija krene, efekt čuvanja od kvarenja ima pad pH, anaerobni uvjeti, otopljeni CO₂ i manjak šećera krajem fermentacije (Hammond i sur., 1999.). Zato će većina kontaminacija napraviti štetu samo u počecima fermentacije što se očituje slabijim prinosom etanola ili nekim esterima koji utječu na aromatski profil (Campbell, 1996, 2003.). No, opasnost ostaje ako se koristi reciklirani kvasac iz pivovare koji, ako se ne provjerava, može biti kontaminiran raznim enterobakterijama, sojevima *Lactobacillus*, *Pediococcus* i *Zymomonas*.

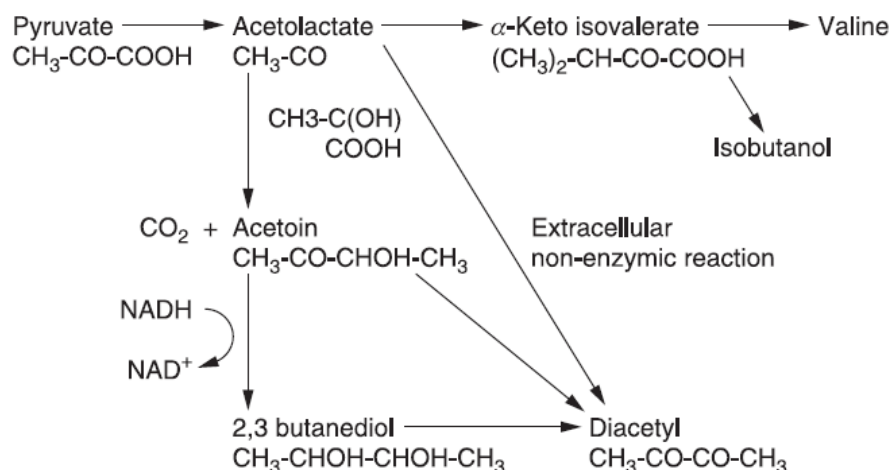
Najčešći i potencijalno najproblematičniji mikroorganizmi u destilerijskoj fermentaciji su bakterije mliječnog vrenja čiji se utjecaj vidi po višoj specifičnoj težini i nižem pH fermentirane sladovine (Dolan, 1976.). Druga moguća okusna mana je maslačna kiselina koja najčešće nastaje utjecajem *Clostridium* spp., a osjeti se i u destilatu. Uvjeti za čistu fermentaciju bez kontaminacije jesu: pouzdan izvor kvasaca, kvalitetna higijena pogona te korištenje kvalitetnog posuđa od nehrđajućeg čelika na kojemu neće doći do nakupljanja bakterija.

Produkti metabolizma kvasaca bitni za kvalitetu destilata

Karbonilni spojevi

Najbitniji karbonilni spoj u destilatima je acetaldehid, direktan nusproizvod alkoholne fermentacije. U nižim koncentracijama daje miris lješnjaka, višanja ili prezrele jabuke, ali više koncentracije su nepovoljne zbog snažnog oporog mirisa. Osim što ima senzorno negativan utjecaj u visokim koncentracijama, kemijski je reaktivan te može izazvati štetne simptome pri konzumiranju kod ljudi. Njegov sadržaj u destilatu primarno je vezan uz korišteni kvasac za fermentaciju (Kwak i sur., 2015.), tijekom fermentacije i odvajanje tokova tijekom destilacije. Interesantna je činjenica kako postoje zamjetne razlike u proizvodnji aldehida između pekarskog, divljeg i pivskog kvasca (Nykanen, 1985.). Ovo je objašnjeno različitom aktivnošću piruvat dekarboksilaze kod pojedinih sojeva kvasca. Daljnji čimbenici koji mogu prouzročiti više razine acetaldehida jesu nedostatak hranjivih tvari tijekom fermentacije, oksidacija alkohola, oksidativna Strecker degradacija aminokiselina te autooksidacija masnih kiselina. Iako acetaldehid predstavlja 90 % (v/v) svih aldehida u destilata, postoje još neki koji utječu na kvalitetu; izobutiraldehid, 2-propenal (akrolein), 3-hidroksi-2-butanone (acetoin) i 2,3-butanedion (diacetil) od čega su akrolein i diacetil ozbiljni aromatski defekti.

Diacetil ulazi u metabolizam dušika gdje je on nusproizvod. Slika 2 pokazuje povezanost izobutanola sa biosintezom valina, ali acetolaktat, posrednik u navedenom biosintetskom putu, je dekarboksiliran i reduciran do acetoina i 2,3-butandiola reakcijama sličnim nastajanju etanola (Young, 1996.; Slaughter, 2002.). Nadalje, tragovi ova tri spoja u sladovini mogu biti neenzimatskom oksidacijom prevedeni u diacetil.



Slika 2. Nastanak diacetila prikazan na reakcijama biosinteze valina (Campbell, 2003.).

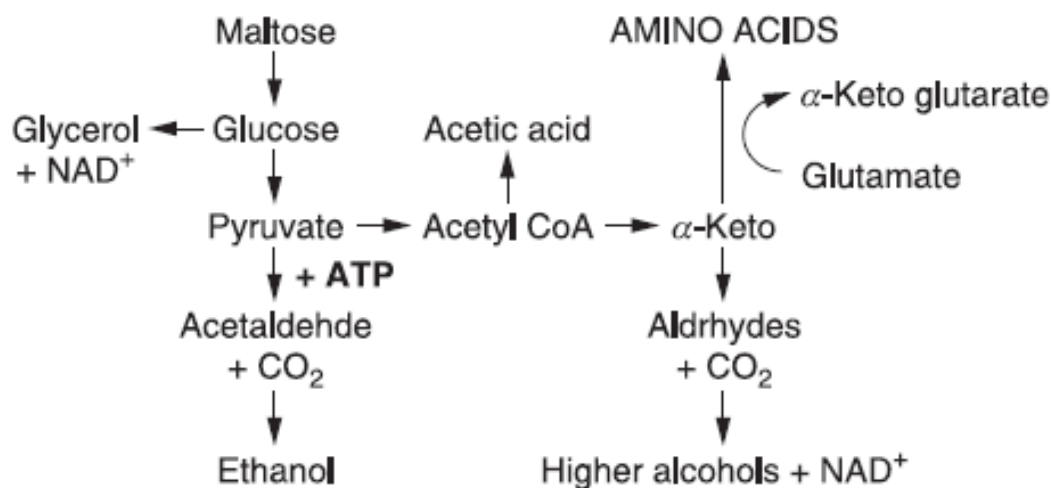
Najčešće se ovo događa ozračivanjem fermentirane sladovine pri punjenu destilacijskog uređaja. Kako su ovakve kemijske reakcije ubrzane višim temperaturama, nastanak diacetila je najjači u početnim fazama destilacije. Sa svojim niskim pragom mirisne detekcije (oko 1 ppm) i hlapivosti sličnoj etanolu, diacetil je jedan od bitnijih hlapivih spojeva, a uz to ga je gotovo nemoguće u potpunosti ukloniti iz destilata.

Acetaldehid i ostali kratkolančani alifatski aldehidi (propanal, butanal, pentanal, (E)-pentenal, 2-metil-1-butanal i 3-metil-1-butanal) imaju opor, užegli i masni miris, što daje neugodnu oštrinu piću (Spaho, 2017.). Uglavnom, aldehidi do 8 ugljika u lancu kao što su acetaldehid, formaldehid, akrolein, benzaldehid i furfural imaju prodorne, izrazito neugodne arome nepoželjne za piće (Alcarde i sur., 2011.). S druge strane, aldehidi dugih lanaca vežu se uz ugodne arome, iako je većina njih prisutno u koncentracijama ispod razine detekcije (Lopez-Vasquez i sur., 2012.).

Viši alkoholi

Viši alkoholi su kvantitativno najveća grupa okusnih spojeva u alkoholnim pićima. Ova skupina se sastoji od alifatskih i aromatskih alkohola čija se formacija može derivirati od amino kiselina. Unutar skupine alifatskih alkohola ulaze amilni alkoholi gdje spadaju 1-propanol, 2-metil-1-propanol (izobutil), 2-metil-1-butanol (aktivni amilni alkohol) i 3-metil-1-butanol (izoamilni alkohol). Visoke koncentracije 1-propanola mogu biti indikator kvarenja sladovine (Spaho, 2017.). Metilbutanoli su najmnogobrojniji nusproizvod kvasca u destilatu te se u usporedbi s ostalim višim alkoholima javljaju u mnogo višim koncentracijama. Feniletilni alkohol najbitniji je predstavnik aromatskih viših alkohola u destilatu. Ima karakterističan miris ruže te zbog svog niskog praga detekcije pridonosi ugodnom mirisu destilata. Bakterije, gljivice i kvasci mogu sintetizirati 2-feniletanol koristeći L-fenilalanin kao supstrat, što znači da koncentracija ovog spoja ovisi primarno o sirovini koja se koristi za fermentaciju.

Viši alkoholi nastaju u metabolizmu dušika pri nedostatku amino dušika, kada keto kiselina ne može biti prevedena u aminokiselinu. Ovakav oksidirani spoj kao keto kiselina ne smije se nakupljati u anaerobnim uvjetima, pa se u metabolizmu kvasca dekarboksilira u ekvivalentni aldehid koji konačno bude reduciran u alkohol slijedom reakcija analognim metabolizmu piruvata u etanol (Slika 3).



Slika 3. Biosinteza aminokiselina ili viših alkohola radom Saccharomyces cerevisiae. Putevi generiraju višak ATP-a ili oksidirani NAD⁺ (Cambell, 2003.).

Također se iz slijeda ovih reakcija vidi kako nastaje suvišak oksidiranog NAD. Ovo upućuje na to da kvasac može prevoditi dio rezervi keto kiselina u više alkohole kako bi generirao oksidirani NAD iako je amino dušik dostupan, što su Quain (1988.) i Slaughter (2002.) opisali u svojim radovima. Ovaj odgovor na redoks problem analogan je proizvodnji glicerola u Embden-Meyerhof-Parnas putu gdje piruvat put bude balansiran sa NAD i generira višak ATP-a, dok je put glicerola balansiran s aspekta ATP-a i generira višak NAD koji se zatim koristi u biosintetskim reakcijama u anaerobnim uvjetima.

Kiseline

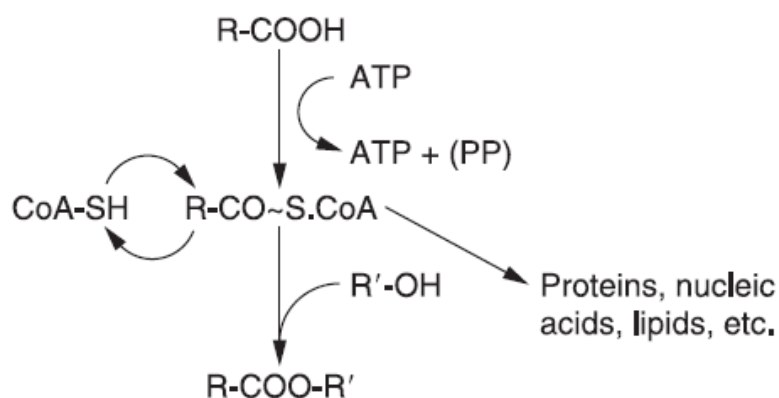
Octena kiselina zastupa više od 90 % (v/v) ukupne kiselosti destilata. Javlja se kao nusprodukt alkoholne fermentacije, u prisustvu kisika ju proizvodi kvasac katabolizmom šećera, ili se stvara oksidacijom acetaldehida. Dakle sadržaj octene kiseline u piću ovisi o korištenom soju kvasca. Povišene koncentracije octene kiseline u fermentiranoj sladovini, kao i smanjena razina etanola, upućuju na kontaminaciju octenim bakterijama. Zbog oporog mirisa i kiselog okusa poželjne su minimalne koncentracije ovog spoja u piću.

Ostale hlapive kiseline bitne za destilat prisutne su u mnogo nižim koncentracijama. To su karboksilne kiseline i masne kiseline kao mravlja, propionska, maslačna, izobuterna, kapronska, undekanska, miristinska, valerinska, 3-metilbutanska, 2-metilbutanska i pelargonska kiselina (Silva i sur., 2000.).

Octena kiselina i dugolančane masne kiseline važni su međuproizvodi u biosintetskim reakcijama, a dio ovih spojeva izgubi se u mediju kulture zbog čega se kasnije javljaju kao hlapivi spojevi, odnosno esteri.

Esteri

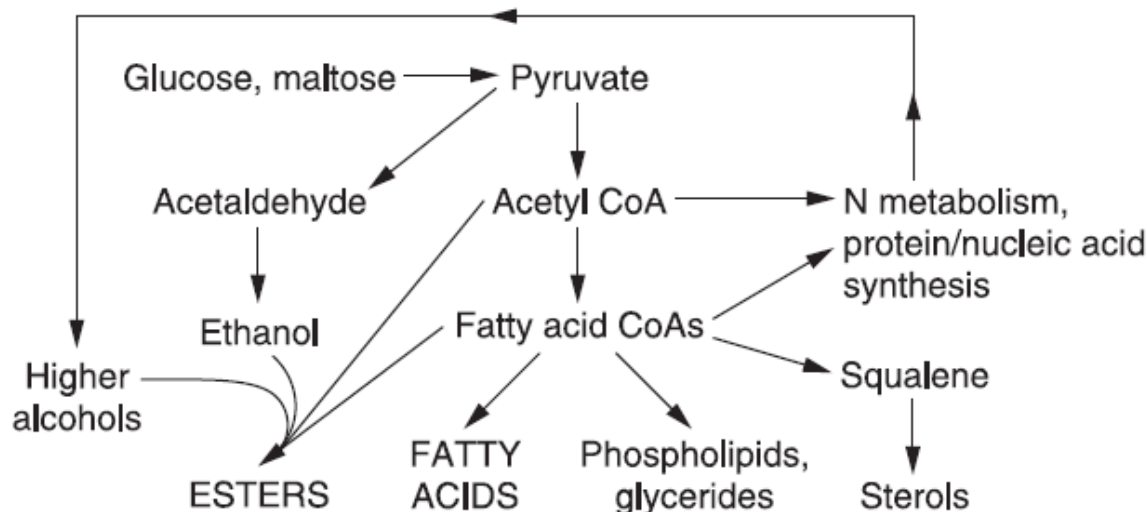
Esteri predstavljaju zasebnu skupinu hlapivih spojeva nastalih tijekom fermentacije. Iako u praksi prevladava vjerovanje kako esteri uglavnom nastaju neenzimatskom esterifikacijom kiselina i alkohola, to nije u potpunosti točno. Ovaj proces je prespor te je važan za razvoj okusa destilata tijekom dozrijevanja, a zasluga za estere nastale tijekom fermentacije ide primarno kvascima. Proizvodnja estera vezana je, prema Nordstromu (1964.) i Peddie (1990.), uz recikliranje koenzima A (CoA). Acetil CoA i njegovi viši homolozi, kolektivno označavani kao $R\text{-CO}\sim\text{S.CoA}$, bitni su međuproducti u biosintezi enzimskih proteina, nukleinskih kiselina i lipida.



Slika 4. Nastajanje estera recikliranjem koenzima A (Campbell, 2003.).

Ako acetil CoA (Slika 4) nije potreban nakon što mu je ATP prenio visoko energetske veze, on mora biti recikliran kako bi se ta energija vratila te kako ne bi došlo do manjka CoA u unutarstaničnom sustavu. CoA izlazi iz strukture, a kiselinska skupina se esterifikacijom stabilizira pomoću esteraza enzima (esteraza katalizira reakciju u oba smjera).

Kako se tijekom fermentacije od kiselina stvara najviše octene, te od alkohola etanol, etil acetat je prvi ester po količini, iako ostali esteri sa nižim pragom detekcije imaju veći utjecaj na fermentiranu sladinu, destilat i konačno whisky. Na slici 5 je širi prikaz recikliranja i uloge CoA u fermentaciji.



Slika 5. Tvorba hlapivih spojeva tijekom fermentacije, te uloga CoA u njihovom nastajanju (Campbell, 2003.).

Materijali i metode

Proces ošećeravanja ječmene kaše proveden je u svibnju 2019. godine u mikropivovari Angeluš u Zelini, Hrvatska. 7 kilograma IREX Pilsner Malta samljeveno je na mlinu te dodano u 30 L vode u tanku za ukomljavanje. Vrijednost pH korigirana je na 5.2 dodatkom 2 ml mliječne kiseline nakon čega je uključen grijač tanka i lopatica za miješanje komine. Kada je komina dostigla ciljanu temperaturu od 62 °C, grijač je isključen te je započeo proces ošećeravanja u trajanju od 60 minuta uz održavanje navedene temperature. Sladovina je filtrirana i ohlađena na 20 °C te je refraktrometrom izmjerena specifična težina od 1.057 (57 °Oe). 20 L sladovine je zatim punjeno u dva bocuna, 10 L u svaki. Pri inokulaciji korišten je dehidrirani kvasac Fermoale AY4 (*Saccharomyces cerevisiae*) i Lalvin EC 1118 (*Saccharomyces cerevisiae*, ex. *bayanus*). Svaki je hidriran i doziran prema uputstvima sa ambalaže. U bocun A dodan je kvasac Fermoale AY4 u količini 8g dehidriranog kvasca na 10 L sladovine, a u bocun B Lalvin EC1118 3 g dehidriranog kvasca na 10 L sladovine.

Kvasac Lalvin EC 1118 (*Saccharomyces cerevisiae*, ex. *bayanus*) koristi se u proizvodnji pjenušavih vina, voćnih vina i cidera, a ono što ga čini potencijalno interesantnim za eksperimentalnu proizvodnju destilata je: kompetitivan karakter, visoka tolerancija na alkohol, kratka lag faza, brzo fermentira u širokom rasponu pH, širok raspon temperatura na kojima fermentira, niske potrebe za dušikom, slaba proizvodnja hlapive kislosti i H₂S te slabo pjenjenje. Karakteristike ovog kvasca koje bi mogle biti nepovoljne u proizvodnji žitnog destilata jesu dobra flokulacija i možda slabija sposobnost za fermentiranjem šećera koji se nalaze u žitnoj sladovini (<https://www.lallemandbrewing.com/en/continental-europe/product-details/lalvin-ec-1118/>).

Fermoale AY4 (*Saccharomyces cerevisiae*) je kvasac gornjeg vrenja koji je idealan za ale vrste

piva, ima dobar fermentabilni kapacitet, izuzetno brzo vrši fermentaciju te su završne arome vrlo čiste. Dobro flokulira i završni stupanj konverzije mu je vrlo kratak što pridonosi visokoj redukciji stvaranja diacetila. Od ovoga kvasca očekivano je bolje iskorištenje šećera žitne sladovine (<https://www.aeb-group.com/en/food-beverage/fermoale-ay4>).

Ovakvi bocuni fermentirali su na sobnoj temperaturi od 20-22 °C sedam dana nakon čega je uslijedila destilacija.

Fermentirana sladovina destilirana je na jednostavnom uređaju tipa „alambic“ kapaciteta 5 L. Prvom destilacijom sladovine bocuna A bez odvajanja tokova dobiveno je 1540 mL destilata (destilat A) alkoholne jakosti 26,6 % vol. Istim postupkom je iz bocuna B dobiveno 1640 mL destilata (destilat B) alkoholne jakosti 24,3 % vol. Zatim je provedena druga destilacija sa oba destilata; od svakoga je u prvim tokom odvojen 1 % volumena (A-15 mL, B-16 mL) te je dobiveno 400 mL srednjeg toka (iznad 50 % volumne jakosti alkohola), treći tok nije odvajan već je destilacija završena. Ovim postupkom je dobiveno 400 mL destilata A alkoholne jakosti 67 % vol., odnosno 400 mL destilata B alkoholne jakosti 64 % vol.

Na ovim uzorcima je zatim provedena analiza kemijskog sastava destilata (alkoholna jakost, titracijska kiselost i ukupni esteri) prema metodama propisanim Pravilnikom o analitičkim metodama za jaka alkoholna pića (NN 138/2005).

Koncentracije metanola, n-propanola, izobutanola, amilnih alkohola (smjesa izomera 3-metil-1-butanola i 2-metil-1-butanola), etil acetata i acetaldehida određene su metodom plinske kromatografije sa SRI 8610C plinskim kromatografom, FID detektorom na koloni MXT WAX 30m, 0.53 mm, 0.25µm df u sljedećim uvjetima; Tpoč=40°C → hold 5 min → Tkon=220 °C, DT= 5°C/min, T(injektor)=230°C, T(detektor)=250°C.

Statistička analiza podataka provedena je s analizom varijance (ANOVA). Za testiranje srednjih vrijednosti korišten je Tukey HSD test pri $p < 0.05$. Analiza je provedena u programu SAS Studio, SAS® OnDemand for Academics.

Rezultati i rasprava

Prve razlike između dvaju različitih kvasca javile su se već u fermentaciji. Kvasac Fermoale AY4 brže je i burnije fermentirao sa stvaranjem velike količine pjene u usporedbi sa kvascem Lalvin EC1118 koji je fermentirao sporije bez pjenjenja. Ovo je očekivao jer je kvasac AY4 pivski kvasac selekcioniran prema svojoj dobroj adaptabilnosti na uvjete u sladovini, odnosno visoke koncentracije disaharida maltoze i iskorištavanje tog šećera. EC1118 vinski je kvasac, te dodatno tome i fruktofilan. Stoga je vjerojatno uzrok sporije fermentacije kvasca EC1118 lošija adaptabilnost na uvjete u sladovini. Nadalje, oba kvasca su flokulirala i stvorila određenu količinu taloga s kojega je prije destilacije bilo potrebno otočiti fermentiranu sladovinu.

Tijekom destilacije, oba uzorka su pjenila te tako otežavali ovaj postupak. Jači plamen, odnosno viša temperatura uzrokovala je jače pjenjenje sladovine. Ovoj pojavi razlog bi

mogao biti i kultivar korištenog ječma, a rješenje bi bilo dodavanje komercijalnih tvari protiv pjenjenja u obliku silikonskih ulja.

Tablica 2 prikazuje rezultate kemijske analize sastava destilata. Prinos u alkoholu je očekivano veći u uzorku A. Titracijska kiselost je tri puta manja u uzorku A, što je opravdano činjenicom kako je to pivski kvasac selekcioniran kako bi imao što manji razvoj octene kiseline. Prema kemijskoj analizi uzorak B razvio je više ukupnih estera, što je očekivano s obzirom na njegovu namjenu. Titracijska metoda analize ukupnih estera prikazuje koncentraciju ukupnih estera preračunato na etil acetat, dok je sadržaj ostalih, pojedinačnih estera prikazan u tablici 3. U konačnici, kemijska analiza dala je rezultate koji su u skladu s namjenom ovih kvasaca.

Tablica 2. Analiza kemijskog sastava destilata A i B.

	Volumen (ml)	Alkoholna jakost (% vol.)	Titracijska kiselost (mg/L a.a.)*	Ukupni esteri (mg/L a.a.)**
FERMOALE AY4 (A)	400	67	53,73	753,52
LALVIN EC1118 (B)	400	64	150,00	797,50

*izraženo kao octena kiselina, **izraženo kao etil acetat

Acetaldehid čini oko 90 % svih prisutnih aldehida u alkoholnom piću, te se prema Nykanenu i Suomalainenu (1983.) koncentracije aldehida kreću od 40 do 220 mg/L a.a. u različitim tipovima whiskyja, a postoje slučajevi Brandyja slabije kvalitete sa čak 600 mg/L a.a. acetaldehida. U nižim koncentracijama daje miris lješnjaka, višanja ili prezrele jabuke, ali više koncentracije su nepovoljne zbog snažnog oporog mirisa. Koncentracije acetaldehida (Tablica 3) su povišene u oba uzorka whiskyja, ali pivski kvasac A ipak je dao niže koncentracije. Njegovo nastajanje primarno je vezano uz korišteni kvasac za fermentaciju (Kwak i sur., 2015.) i tijekom fermentacije. Ovo je objašnjeno različitom aktivnošću piruvat dekarboksilaze kod pojedinih sojeva kvasca. Daljnji čimbenici koji mogu prouzročiti više razine acetaldehida jesu nedostatak hranjivih tvari tijekom fermentacije, oksidacija alkohola, oksidativna Strecker degradacija aminokiselina te autooksidacija masnih kiselina.

Metanol ne daje ikakva organoleptička svojstva piću te, iako je alkohol, ne nastaje tijekom fermentacije kao viši alkoholi, već se izdvaja iz pektina. Vrijednosti metanola u whiskyju rijetko premašuju 500 mg/L (Nykanen, 1985.), pa su tako i u uzorcima A i B te vrijednosti niske.

Tablica 3. Koncentracije metanola, n-propanola, izobutanola, amilnih alkohola (smjesa izomera 3-metil-1-butanola i 2-metil-1-butanola), etil acetata i acetaldehida određene metodom plinske kromatografije.

Spoj (mg/L a.a.)	EC1118 – B	AY4 – A
Acetaldehid	356.16 ^a	273.93 ^b
Metanol	200.76 ^a	96.04 ^b
n-Propanol	596.44 ^a	452.15 ^b
Izobutanol	387.41 ^a	293.19 ^b
n-Butanol	13.26 ^a	5.27 ^b
Metilbutanoli	2573.42 ^a	1410.88 ^b
Uk. viši alkoholi	3570.53	2161.49
Etil heksanoat	n.d.	3.48
Etil laktat	6.93 ^b	21.73 ^a
Etil oktanoat	9.02 ^b	10.12 ^a
Etil dekanoat	6.34 ^a	4.10 ^b
Dietil sukcinat	4.37 ^b	9.40 ^a
Feniletanol	31.39 ^a	18.03 ^b

n.d. - nije detektirano; različita slova u istom redu predstavljaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti pri $p < 0.05$ (Tukey test).

Viši alkoholi imaju bitnu ulogu u aromatskom profilu destilata. U nižim koncentracijama daju ugodan okus i karakter destilatu, dok više koncentracije mogu biti negativne tako što daju težak i opor miris i okus (Soufleros i sur., 2004., Cortes i Fernandez, 2005.). Povišene koncentracije viših alkohola, više od 3500 mg/L a.a., smatraju se indikatorom niže kvalitete (Cortes i sur., 2011.). U tablici 4 prikazane su uobičajene koncentracije viših alkohola u destiliranim pićima.

Tablica 4. Sadržaj (mg/L) viših alkohola u destiliranim pićima (Nykanen i Suomalainen, 1983.).

Piće	Propanol	izobutanol	2-metilbutanol + 3-metilbutanol
Škotski whisky	200-205	350-410	410-475
Kanadski whisky	U tragovima	550-800	150-230
Bourbon whisky	145	445	1685

Kvasac uzorka B sintetizirao je daleko više viših alkohola od kvasca uzorka A, alifatskih i aromatskih. Ova pojava može upućivati na veću potrebu kvasca B za aminokiselinama tijekom fermentacije ili radom ovoga kvasca javljaju specifični redoks uvjeti gdje je primoran generirati više spoja NAD^+ . Prema Spaho (2017.) koncentracija viših alkohola ovise o sirovini, uvjetima fermentacije, tehnici destilacije i destilacijskoj opremi.

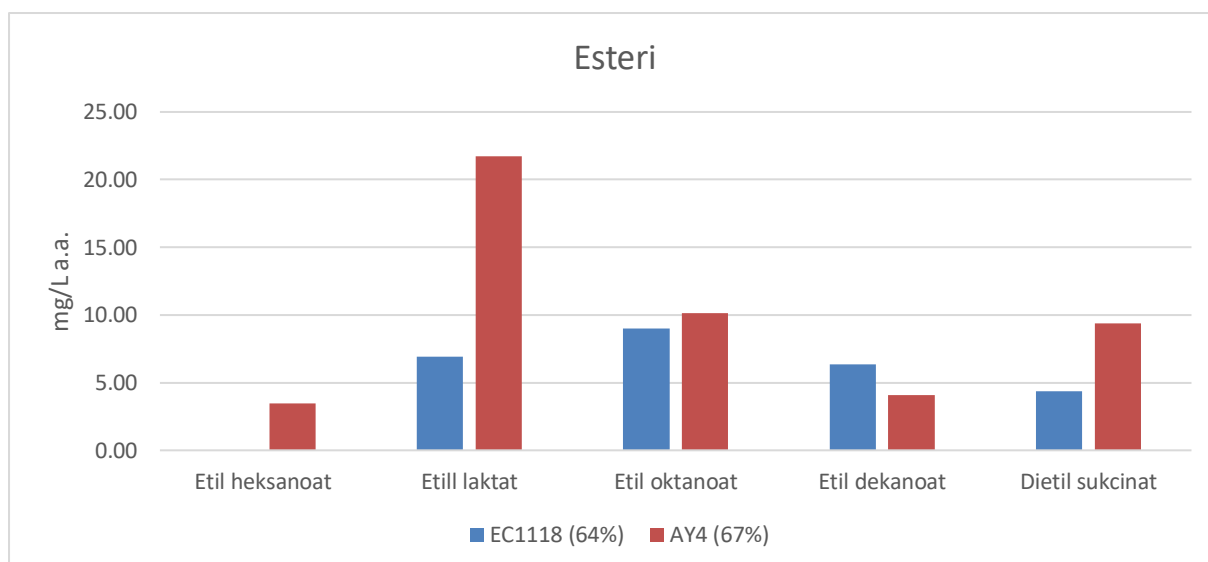
Esteri masnih kiselina brojčano su najveća skupina spojeva u alkoholnim pićima. Kao hlapivi spojevi koji daju ugodan miris, imaju bitnu ulogu u aromi pića. Uloga i doprinos pojedinih estera u velikoj mjeri ovisi o njihovoj koncentraciji. Najpoznatiji je Nordstromov (1964.) opis mehanizma tvorbe estera gdje acil-CoA ima ključnu ulogu. Tijekom fermentacije, kvasac proizvodi acil-CoA u stanici ili aktivacijom masnih kiselina ili oksidativnom dekarboksilacijom keto kiselina. Prvi mehanizam troši ATP, a drugi ne. Produženje ugljičnog lanca masne kiseline odvija se tako da se malonil-CoA veže sa acil-CoA u enzimski kompleks, pri čemu donosi u lanac kiseline nova dva ugljikova atoma. Konačni korak je odvajanje enzima od kompleksa; u prisustvu alkohola nastaje ester, a u mediju bez alkohola, slobodna masna kiselina. Istraživanja potvrđuju činjenicu kako se različiti sojevi kvasaca razlikuju u proizvodnji estera (Sponholz i sur., 1974., Nykanen i sur., 1977a i 1977b).

Kemijskom analizom utvrđena je koncentracija etil acetata, a kromatografijom koncentracije etil heksanoata, etil laktata, etil oktanoata, etil dekanata te dietil sukcinata (Tablica 3). Etil acetat je ester koji se u destilatima javlja u najvećoj mjeri te u umjerenim koncentracijama pridonosi ugodnom mirisu i voćnom karakteru, dok u visokim koncentracijama daje karakterističan i oštar miris na ljepilo. Etil acetat je također bitan jer se omjer koncentracije ukupnih estera i koncentracije etil acetata koristi kao indikator kvalitete destilata (Spaho, 2017.). Viša vrijednost ovog omjera znači viša kvaliteta konačnog proizvoda.

Etil laktat daje destilatu maslačni karakter te je njegova pojava vezana uz malolaktičnu fermentaciju. U koncentracijama nižim od 154 mg/L (Bouglas, 2009.) je poželjan, stabilizira miris i omekšava čvrst karakter određenih spojeva (Soufleros i sur., 2004.). Etil laktat se pronalazi u višim koncentracijama u destilatima dobivenim na „alambic“ uređaju dvostrukom destilacijom (Spaho, 2017.). Rast mliječnih bakterija tijekom stacionarne faze na rezidualnim dekstrinima i pentozama koje kvasac ne može fermentirati, trehalozi te dušičnim spojevima produktima autolize kvasaca, smatra se vrijednim izvorom hlapivih spojeva u fermentiranoj slakovini i konačno u samom whiskyju (Geddes, 1985., Barbour i Priest (1988.)).

Dietil sukcinat daje patočni i kamforni karakter (Ferreira i sur., 1999.) te proizlazi primarno od bakterijskog kvarenja (Karagiannis i Lanaridis, 2002.).

Etilni esteri masnih kiselina srednje dugih lanaca (C6-C12) su od posebnog interesa u fermentiranim pićima zato što pridonose voćnim i cvjetnim aromama, a relativno su visokih koncentracija (Rodriguez i sur., 2013.). Proizvedeni su tijekom fermentacije sirovine. Etil heksanoat daje voćne arome, pa je poželjan u što većim količinama, etil oktanoat je više opor i manje mirisan, a etil dekanat je manje intenzivan te daje masne note.



Graf 3. Sadržaj estera u uzorcima A (AY4) i B (EC1118).

Kvasac B je proizveo više etil acetata (Tablica 2), dok je kromatografijom dokazana veća proizvodnja ostalih estera (Graf 3) kod kvasca A u odnosu na kvasac B. Što znači da je uzorak B bio bogatiji etil acetatom, dok je uzorak A bogatiji ostalim esterima koji pridonose kompleksnosti arome i punoći destilata. To je posebno istaknuto u koncentracijama etil laktata. Iako u povišenim koncentracijama vezan uz kvarenje, etil laktat u ovako niskim koncentracijama ima veoma povoljan utjecaj na aromu whiskyja. Geddes (1985.), Barbour i Priest (1988.) navode kako malolaktična fermentacija krajem alkoholne fermentacije pridonosi u velikoj mjeri rasponu hlapivih spojeva te tako i kvaliteti samog whiskyja.

Walker i sur. su 2012. razvili tablicu (Tablica 5) kvantitativnih kriterija za mjerenje performanse kvasca za destiliranje tijekom fermentacije koja bi mogla biti smjernica za daljnja istraživanja na ovom području.

Tablica 5. Performanse fermentacije destilacijskog kvasca: kvantitativni kriteriji (Walker i sur., 2012.).

Kriterij (performansa fermentacije)	Analitička metoda (primjeri)
Prinos u etanolu	Računica bazirana na konverziji škroba žitarice u etanol
Brzina razvijanja CO ₂	Mjerač protjecanja plina
Fermentacija u mediju visoke specifične težine	Početna specifična težina, zdravstveno stanje kvasca, pad pH
Iskorištenje šećera (pr. maltotrioza)	HPLC
Karakter destilata (mirisne mane, patočna ulja)	Senzorna evaluacija, GC
Postotak živih kvasaca i njihovo zdravlje	Flow cytometry
Odgovori na stres	"
Životni ciklus stanice kvasca	"
Specifične osobine vezane uz destilaciju/proizvod/namjenu	Genetski markeri

Zaključak

Analizom uzoraka utvrđena je očekivana razlika u radu kvasaca korištenih u pokusu. Vinski kvasac uzorka B pokazao sposobnost fermentirati u uvjetima žitne sladovine, te je čak dao relativno dobar prinos etanola. Oba uzorka sadržavali su povišene razine viših alkohola koje odgovaraju razinama Bourbon whiskyja, ali kvasac EC1118 istaknuo se mnogo višim koncentracijama viših alkohola čije vrijednosti već ulaze u rang destilata slabije kvalitete. S druge strane kvasac AY4 proizveo je više estera koji pridonose kompleksnosti arome i punoći okusa destilata. Oba kvasca su pokazala kako mogu proizvesti destilat te bi bilo interesantno ispitati utjecaj ovih kvasaca u uvjetima fermentacije prilagođenim onima u destileriji (brza fermentacija u uvjetima visoke temperature u mediju visoke specifične težine).

Literatura

Alcarde A. R., Souza P. A., Belluco A. E. S. (2011). Chemical profile of sugarcane spirits produced by double distillation methodologies in rectifying still. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas. 2011;31:355–360. ISSN 0101-2061.

Baker C. J. (1991). *Recommended Methods of Analysis*. Institute of Brewing.

Barbour E. A. i Priest F. G. (1988). *Journal of the Institute of Brewing*, 94, 89.

Barnett J.A., Payne R. W. i Yarrow D. (1990). *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge University Press.

Bouglas N. V. (2009). *Evaluation of the Effect of Pot Still Design on the Resultant Distillate*. Stellenbosch University: Faculty of AgriScience.

Boulton C. A. i Quain D. E. (2001). *Brewing Yeast & Fermentation*. Blackwell.

Buglass A. J., McKay M., Lee C. G. (2011). Distilled Spirits, u *Handbook of Alcoholic Beverages*, Volume 1,(urednik Buglass A. J.), John Wiley and Sons, Chichester, 555-627.

Campbell I. (2003). Yeast and fermentation, u *Whisky Technology, Production and Marketing*, uredio Russel I., Elsevier, 117-155.

Campbell I. (1996). *Brewing Microbiology*. 2. izdanje, (urednici Priest F. G. i Campbell I.) p.1. Chapman and Hall.

Cortes S., Gil M. L., Fernandez E. (2005). Volatile composition of traditional and industrial Orujo spirits. *Food Control*. 2005;16:383-388. DOI: 10.1016/j.foodcont.2004.04.003.

Cortes S., Rodriguez R., Salgado J.M., Dominguez J.M. (2011). Comparative study between Italian and Spanish grape marc spirits in terms of volatile compounds. *Food Control*. 2011;22:673-680.

Dolan T. C. S. (1976). *Journal of the Institute of Brewing*, 82, 177.

Enari T. M., Makinen V. i Haikara A. (1970). *Technical Quarterly*. 7(1), 11.

Ferreira V., Hernandez-Orte P., Escudero A., Lopez R., Cacho J. (1999). Semipreperative reversed phase liquid chromatographic fractionation of aroma extracts from wine and other alcoholic beverages. *Journal of Chromotography A*. 1999;864:77–88. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)01004-3.

Geddes P. (1985). *Journal of the Institute of Brewing*. 91, 56.

Hammond J. R. M., Brennan M., i Price A. (1999). *Journal of the Institute of Brewing*. 105, 113.

- Hardy P. J. i Brown J. H. (1989). U: The Science and Technology of Whiskies (J. R. Piggott, R. Sharp and R. E. B. Duncan, eds), p. 182. Longman.
- Hay J. D., Jones R. C., McInnes A. i sur. (1994). Proceeding of the Fourth Aviemore Conference on Malting, Brewing and Distilling, (urednici Campbell I. i Priest F. G.) p. 361. Institute of Brewing.
- Hough J. S., Briggs D. E., Stevens R. i Young T. W. (1982). Malting and Brewing Science. Volume II, Hopped Wort and Beer. Chapman and Hall.
- Jones R. C. (1998). U: Proceedings of the Fourth Aviemore Conference on Malting, Brewing and Distilling (I. Campbell, ed.), p. 65. Institute of Brewing.
- Karagiannis S. i Lanaridis P. (2002). Insoluble grape material present in must affects the overall fermentation aroma of dry white wines made from three grape cultivars cultivated in Greece. *Journal of Food Science*. 2002;67:369–374. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb11412.x.
- Kwak H.S., Seo J.S., Hur Y., Shim H.S., Lee Y., Kim M., Jeong Y. (2015). Influence of yeast strains on the physicochemical characteristics, methanol and acetaldehyde profiles and volatile compounds for Korean rice distilled spirit. *Journal of the Institute of Brewing*. 2015;121:574–580. DOI: 10.1002/jib.268.
- López-Vázquez C., Orriols I., Perelló M. C., Revel G. (2011). Determination of aldehydes as pentafluorobenzyl derivatives in grape pomace distillates by HS-SPME-GC/MS. *Food Chemistry*. 2012;130:1127–1133. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.07.140.
- Mochaba F. M., O'Connor-Cox E. S. C. i Axcell B. C. (1997). *Journal of the Institute of Brewing*, 103, 99.
- Neto H. B. A., Yohannan B. K., Bringhurst T.A., Brosnan J. M., Pearson S. Y., Walker J.W., Walker G.M. (2009). Evaluation of a Brazilian Fuel Alcohol Yeast Strain for Scotch Whisky Fermentations. *J. Inst. Brew.* 115(3), 198-207, 2009.
- Nordstrom K. (1964). *Journal of the Institute of Brewing*, 70, 328.
- Nykanen L. (1985). Formation and Occurrence of Flavor Compounds in Wine and Distilled Alcoholic Beverages. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 37, No. 1.
- Nykanen L. i Nykanen I. (1977a). Production of esters by different yeast strains in sugar fermentations. *J. Inst. Brew.* 83:30-1.
- Nykanen L., Nykanen I. i Suomalainen H. (1977b). Distribution of esters produced during sugar fermentation between the yeast cell and the medium. *J. Inst. Brew.* 83:32-4.

- Nykanenu L. i Suomalainen H. (1983). *Aroma of Beer, Wine and Distilled Alcohol Beverages*. Riedel.
- Peddie H. A. B. (1990). *Journal of the Institute of Brewing*. 96, 327.
- Pratt-Marshall P. L., Brey S. E., de Costa S. D. (2002). *Brewers' Guardian*, 131(3), 22.
- Pravilnik Europske unije o jakim alkoholnim pićima (2009). *Narodne novine* br. 61/09).
- Pravilnik o analitičkim metodama za jaka alkoholna pića (2005). *Narodne novine* br. 138/05.
- Quain D. E. (1988). *Journal of the Institute of Brewing*. 94, 315.
- Rodriguez Madrera R., Garcia Hevia A., Valles B. S. (2013). Comparative study of two aging systems for cider brandy making. Changes in chemical composition. *LWT – Food Science and Technology*. 2013;54:513–520. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.037>.
- Silva M. L., Macedo A. C., Malcata F. X. (2000). Review Steam distilled spirits from fermented grape pomace. *Food Science and Technology International*. 2000;6:285–300. DOI: 10.1177/108201320000600403.
- Slaughter J. C. (2002). *Brewing Microbiology*, 3. izdanje (urednici Priest F. G. i Campell I.). Aspen (u časopisu). **19.
- Soufleros E. H., Mygdalia A. S., Natskouli P. (2004). Characterization and safety evaluation of the traditional Greed fruit distillate „Mouro“ by flavour compounds and mineral analysis. *Food Chemistry*. 2004;86:625–636. DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.11.006.
- Spaho N. (2017). Distillation Techniques in the Fruit Spirits Production. *Distillation – Inovative Applications and Modeling*. DOI: 10.5772/66774.
- Sponholz W. R. i Dittrich H.H. (1974). Die Bildung von SO₂-bindenden Gärungs-Nebenprodukten, höheren Alkoholen und Estern bei einigen für die Weinbereitung wichtigen „wilden“ Hefen. *Wein Wiss.* 29:301-14.
- Stratford M. (1992). *Advances in Microbial Physiology*. 33, 1.
- Walker G., Brosnan J., Bringham T. i Jack Frances (2012). Selecting new distilling yeast for improved fermentation and for sustainability. Yeast Research Group, School of Contemporary Sciences, University of Abertay Dundee, Dundee DD1 1HG; Scotch Whisky Research Institute, Research Avenue North, Riccarton, Edinburgh, EH14 4AP.
- Walsh R. M. i Martin P.A. (1978). *Journal of the Institute of Brewing*. 83, 169.
- Young T. W. (1996). *Brewing Microbiology*, 2. izdanje (urednici Priest F. G. i Campell I.). p. 15. Chapman and Hall.

Internet stranice

<https://www.lallemandbrewing.com/en/continental-europe/product-details/lalvin-ec-1118/>

(Pristupljeno 20.9.2019.)

<https://www.aeb-group.com/en/food-beverage/fermoale-ay4> (Pristupljeno 20.9.2019.)

<https://bitesizebio.com/13687/cell-counting-with-a-hemocytometer-easy-as-1-2-3/> (Pristupljeno 6.9.2019.)